

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 深山 真史

様々な地球環境の悪化に対して、不良環境でも生育できる環境耐性植物の育成が世界的な規模で試みられている。その1つが、塩類集積土壌で生育しうる耐塩性植物の育種であり、モデル植物をはじめ、いくつかの植物から耐塩性遺伝子が単離されている。本研究は、耐塩性育種のための遺伝子源としてマングローブ植物のオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) に着目して、植物の耐塩性を強化する新規の耐塩性遺伝子の同定を行なったものである。本論文の内容は、主に3つの章から構成されている。

1. Expressed Sequence Tags (EST) シークエンシングによるオヒルギ遺伝子の解読および発現解析

オヒルギ遺伝子を解読するため、EST シークエンシングを行い、14,842 個の EST を得た (DDBJ アクセション番号 BP938635 - BP953476)。これをクラスタリングして、6943 個の重複のない遺伝子配列を得た。このうち、4339 個 (62.5%) は、既知の配列と有意な配列相同性 ($E \leq 10e-5$) を示した。

次に、3701 個の EST から構成される 129 個の遺伝子について、EST の冗長度に基づいて発現を定量し、この結果をクラスタリング解析したところ、オヒルギの組織特異的および共通の遺伝子発現が明らかになった。

2. DNA マイクロアレイを用いたオヒルギの塩応答性遺伝子の同定

まず、7029 個のオヒルギ遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイを用いて、塩処理 (500 mM NaCl) 前後のオヒルギの上位展開葉、下位展開葉および根における遺伝子発現を解析したところ、塩処理によって 5 倍以上のアップレギュレート (ダウンレギュレート) された 228 (61) 個の遺伝子を同定した。

次に、11997 個のオヒルギ遺伝子断片を搭載したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、塩および浸透圧処理前後のオヒルギの葉の遺伝子発現を解析した結果、塩および浸透圧処理で有意に発現量の異なる 865 個の遺伝子を同定した。この 865 個の遺伝子のうち、2 倍以上

アップレギュレート（ダウンレギュレート）された遺伝子は 380（588）個であった。

続いて、11,997 個の遺伝子断片を搭載したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、オヒルギの主根および側根における塩処理前後の遺伝子発現を解析した結果、主根で 403 個、側根で 175 個の遺伝子が、塩処理によって 2 倍以上アップレギュレートされたことが分かった。

3. オヒルギの塩応答性遺伝子の機能解析

DNA マイクロアレイによって同定された塩応答性遺伝子のうち既知の塩応答性遺伝子などを除いた、40 個の候補遺伝子をアグロバクテリウムに導入して、421 mM NaCl を含む LB 寒天培地において培養したところ、*BgZF1*、*BgARPI*、*BgLTP* 遺伝子の組換え株は、GUS 組換え株と比較して、大きいコロニーを形成した。続いて、これらの 3 個の遺伝子をシロイヌナズナに導入して、機能解析を実施した。播種後 6 日目の組換え体の芽ばえを、0、100、125、150、175 mM NaCl を含む 1/2 MS 培地に移植し、移植後 11 日目に新鮮重を測定したところ、*BgLTP* の 1 系統（3 系統中）、*BgARPI* の 2 系統（3 系統中）の新鮮重が、野生型のものよりも有意に大きかった。*BgARPI* 組換え体について、詳細に解析したところ、200 mM 塩処理をした播種後 28 日目の *BgARPI* 組換え体においては、野生型と比較して、Na⁺ 濃度の増加が若干遅く、K⁺ 濃度の低下が遅くなっており、さらに塩応答性遺伝子の *RD29A*、*RD29B* および *RD22* の発現応答も、軽減および遅延していた。

以上により、*BgARPI* の組換え体は、*BgARPI* を介したシグナル伝達経路の活性化または抑制により、*RD29A*、*RD29B* および *RD22* が関与するパスウェイの過剰な塩応答が抑制されたこと、K⁺/Na⁺ の恒常性が維持されたことなどによって、野生型よりも高い耐塩性を発現したのではないかと推定した。

以上、本研究は、耐塩性植物であるマングローブの 1 種のオヒルギを材料に、新規の耐塩性遺伝子の単離を目的に行ったものである。発現遺伝子の網羅的な解析をもとに新規の耐塩性遺伝子を単離し、それがシロイヌナズナにも耐塩性を付与することを明らかにしたものであり、学術上、応用上価値が高い。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。